

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Houby ovocných dřevin se zvláštním zřetelem k rodu *Neofabraea*

Fungi of the fruit trees with special reference to genus *Neofabraea*

Kamila Pešicová

2010

Školitel: RNDr. David Novotný, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím uvedené literatury.

V Příbrami dne 28. dubna 2010

Kamila Pešicová

Poděkování

Předně děkuji svému školiteli RNDr. Davidu Novotnému, Ph.D. za spoustu času, který mi věnoval, odborné rady při psaní práce a pomoc s vyhledáváním literatury.

Dále děkuji své rodině za všestrannou podporu.

Abstrakt

Tato práce je literární rešerše týkající se hub žijících v asociaci s ovocnými dřevinami se zvláštním zřetelem k rodu *Neofabraea*. Je zaměřena zejména na endofytické houby všech ovocných dřevin mírného pásu a dále na fytopatogenní houby jádrovín.

Rod *Neofabraea* je významný fytopatogenní rod, jehož zástupci napadají především jabloň a hrušeň a způsobují onemocnění kůry (antraknózu a rakovinu kůry) a kruhovou hnědou hnilobu plodů. Jejich identifikace a detekce je při použití klasických mykologických a mikrobiologických metod obtížná, neboť tyto druhy v *in vitro* podmínkách většinou nesporulují. Proto se používají moderní, imunochemické nebo molekulárně-genetické metody.

Klíčová slova: endofyty, fytopatogenní houby, ovocné dřeviny, jádroviny, antraknóza, rakovina kůry, kruhová hnědá hniloba, *Neofabraea*, *Pezicula*

Abstract

This thesis is a literature review concerning fungi associated with the fruit trees with special reference to genus *Neofabraea*. It is intend on endophytic fungi of all fruit trees and on pathogenic fungi of pome fruit.

The genus *Neofabraea* is an important pathogenic genus whose representatives attack mainly apple and pear trees and cause bark diseases (anthracnose canker and perennial canker) and bull's eye rot of fruits. Identification and detection of them is difficult using conventional mycological and microbiological methods because these species usually do not sporulate *in vitro*. Therefore they are used modern, immunochemical or molecular-genetic methods.

Keywords: endophytes, phytopathogenic fungi, fruit trees, pome fruit, anthracnose canker, perennial canker, bull's eye rot, *Neofabraea*, *Pezicula*

Obsah

1	Úvod	2
2	Rozdělení ovocných plodin	2
3	Houby ovocných dřevin	4
3.1	<i>Endofytické houby</i>	<i>4</i>
3.2	<i>Vybrané houbové choroby jaderovin</i>	<i>7</i>
3.2.1	Strupovitost jabloní (apple scab)	7
3.2.2	Strupovitost hrušní (pear scab)	8
3.2.3	Padlí jabloňové (apple mildew)	8
3.2.4	Septorióza hrušní (leaf spot of pear)	9
3.2.5	Rzivost hrušně (pear rust)	9
3.2.6	Moniliová hniloba (brown rot)	10
3.2.7	Peniciliová hniloba (blue mould)	11
3.2.8	Antraknóza (anthracnose canker) a rakovina kůry (perennial canker)	12
3.2.9	Kruhová hnědá hniloba (bull's-eye rot)	13
4	Rod <i>Neofabraea</i>	15
4.1	<i>Neofabraea alba</i> (E. J. Guthrie) Verkley	17
4.2	<i>Neofabraea krawtzevii</i> (Petr.) Verkley	18
4.3	<i>Neofabraea malicorticis</i> H. S. Jacks.	19
4.4	<i>Neofabraea perennans</i> Kienholz	20
4.5	<i>Cryptosporiopsis kienholzii</i> Seifert, Spotts & Lévesque	20
4.6	<i>Identifikace a detekce</i>	<i>21</i>
4.6.1	Molekulárně-genetické metody	22
4.6.2	Imunochemické metody	23
5	Závěr	25
6	Použitá literatura	26

1 Úvod

Tato práce shrnuje poznatky o houbách žijících v asociaci s ovocnými dřevinami. Důraz je kladen na houby endofytické a dále jsou uvedeny nejdůležitější fytopatogenní houby jádrovin. Mykorrhizní houby nejsou předmětem této práce.

Práce je zaměřena na ovocné dřeviny mírného pásu a netýká se tropických ani subtropických plodin. Největší pozornost je věnována jádrovinám. Nejenže jsou naší nejdůležitější skupinou ovoce, ale také jsou hostiteli čtyř z pěti druhů fytopatogenního rodu *Neofabraea*. Nejvýznamnější ovocnou dřevinou v České republice je jabloň, která tvoří největší podíl na sklizeném ovoci. Podle údajů z roku 2009 je hmotnost sklizených jablek 21× větší než hmotnost v pořadí druhých višní. Hrušeň je na třetím místě (Anonymus 2010). Spotřeba čerstvého ovoce v České republice se meziročně zvyšuje. V roce 2008 činila 89,1 kg na osobu a rok, z toho 54,1 kg připadá na ovoce mírného pásma a zbytek tvoří jižní ovoce (Anonymus 2009a). Optimální spotřeba ovoce je podle doporučení lékařů přibližně 100 kg (Blažek 2001).

2 Rozdělení ovocných plodin

Všechny ovocné plodiny, vyjma jahodník a maliník, patří mezi dřeviny. Jahodník je víceletá bylina a maliník polokeř (Blažek et al. 2001).

Ovocné plodiny pěstované na našem území se řadí do 10 čeledí. Nejvýznamnější z nich je čeleď *Rosaceae*, do které patří *Malus* Mill. (jabloň), *Pyrus* L. (hrušeň), *Cydonia* Mill. (kdouloň), *Sorbus* L. (jeřáb), *Prunus* L. (slivoň, třešeň, meruňka, broskvoň, mandloň), *Rubus* L. (ostružiník), *Rosa* L. (růže) a *Mespilus* L. (mišpule). Další čeledi a jejich zástupci jsou *Juglandaceae* – *Juglans* L. (ořešák), *Corylaceae* – *Corylus* L. (líška), *Caprifoliaceae* – *Lonicera* L. (zimolez), *Sambucaceae* – *Sambucus* L. (bez), *Cornaceae* – *Cornus* L. (dřín), *Eleagnaceae* – *Hippophaë* (rakytník), *Grossulariaceae* – *Ribes* L. (meruzalka), *Vacciniaceae* – *Vaccinium* L. (brusnice), *Dilleniaceae* – *Actinidia* L. (aktinidie) (Blažek et al. 2001, jména a zařazení podle Kubát et al. 2002).

Hospodářsky se ovoce dělí podle typu plodu na jádroviny, peckoviny, ovoce skořápkaté, drobné ovoce a dále méně rozšířené ovocné druhy. Jádroviny, jejichž plodem je malvice, zahrnují jabloň (*Malus* sp.), hrušeň (*Pyrus* sp.), kdouloň obecnou (*Cydonia oblonga* Mill.), mišpuli obecnou (*Mespilus germanica* L.), temnoplodec černoplodý (tzv. černý jeřáb) (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott) a jeřáb moravský sladkoplodý (*Sorbus aucuparia* var. *moravica* Zang) (Blažek et al. 2001, jména podle Kubát et al.

2002). Na vzniku kulturních odrůd jabloní se podílely hlavně druhy *Malus sylvestris* Mill. (jabloň lesní), *M. pumila* Mill. (j. nízká), *M. prunifolia* Borkh. (j. slívolistá) a *M. baccata* (L.) Borkh. (j. drobnoplodá). Velký význam má také *M. floribunda* van Houtte (j. mnohokvětá), z níž byly vyšlechtěny odrůdy rezistentní vůči strupovitosti. Všechny kulturní odrůdy jabloní se dnes zjednodušeně řadí do hybridního druhu *M. × domestica* Borkh. (j. domácí). Dalšími druhy jabloně jsou *M. dasycphylla* Borkh. (j. plstnatá), *M. orientalis* Uglitz. (j. východní), *M. niedwetziana* Dieck. (j. Niedwetzského), *M. coronaria* Mill. (j. korunovitá), *M. sargentii* Rehd. (j. Sargentova) (Sus et al. 2000). Kulturní odrůdy hrušní evropského typu patří do druhu *Pyrus communis* L. (hrušeň obecná). Kulturní odrůdy asijských hrušek (Nashi) jsou odvozeny od druhů *P. pyrifolia* (Burn.) Nak., *P. serotina* Rehd. a *P. ussuriensis* Max. (Blažek et al. 2001).

Plodem peckovin je peckovice s dužnatým (nebo v případě mandloně suchým) oplodím a patří mezi ně třešeň (*Prunus avium* (L.) L.), višně (*P. cerasus* L.), mahalebka obecná (*P. mahaleb* L.), slivoň švestka (*P. domestica* L.), slivoň obecná (*P. insititia* L.), slivoň myrobalán (*P. cerasifera* Ehrh.), meruňka obecná (*P. armeniaca* L.), broskvoň obecná (*P. persica* (L.) Batsch) a mandloň obecná (*P. dulcis* (Mill.) D.A. Webb) (Blažek et al. 2001, jména podle Kubát et al. 2002).

Ovoce skořápkaté se pěstuje pro olejnatá semena, která jsou kryta pevnou skořápkou. Řadíme sem trojí ovocné dřeviny s různým typem plodu, a to ořešák královský (*Juglans regia* L.) s peckovicí, lísku obecnou (*Corylus avellana* L.) s oříškem a kaštanovník jedlý (*Castanea sativa* Mill.) s nažkou (Blažek et al. 2001, jména podle Kubát et al. 2002).

Skupinu drobného ovoce tvoří bobuloviny: rybíz černý (*Ribes nigrum* L., *R. dikuscha* Fisch., ...), rybíz červený, resp. bílý (*R. rubrum* L., *R. petraeum* Wulfen.), angrešt (*Ribes uva-crispa* L.), borůvka (*Vaccinium myrtillus* L., *V. corymbosum* L., *V. angustifolium* L.), brusinka (*V. vitis-idaea* L.), klikva bahenní (*Oxycoccus palustris* Pers.) a réva vinná (*Vitis vinifera* L.), jejichž plodem je bobule, dále ostružiník (*Rubus caesius* L., *R. fruticosus* agg.) a maliník (*R. idaeus* L., *R. occidentalis* L., ...), které mají souplodí peckoviček, a jahodník (*Fragaria × ananassa* Ducl., *F. vesca* L., ...), jenž má souplodí nažek (Blažek et al. 2001, jména podle Kubát et al. 2002).

Pod pojmem méně rozšířené ovoce si lze představit např. bez černý (*Sambucus nigra* L.), dřín jarní (*Cornus mas* L.), růži dužnoplodou (*Rosa villosa* L.) nebo rakytník řešetlákovitý (*Hippophaë rhamnoides* L.) (Blažek et al. 2001, jména podle Kubát et al. 2002).

Další dělení ovocných plodin je podle způsobu upotřebitelnosti. Rozlišuje se ovoce stolní neboli dezertní, které se konzumuje v čerstvém stavu za syrova, kuchyňské (na pečení a vaření) a ovoce na zpracování, což zahrnuje sušení, mražení, výrobu kompotů, moštů a zavařenin. Plody některých jedinců jsou využívány pro semenné účely, z osiva se pěstují generativní podnože, které slouží pro další rozmnožování ovocných rostlin (Blažek et al. 2001).

3 Houby ovocných dřevin

Vztahy mezi houbou a rostlinou jsou velmi složité. Nedají se jednoduše rozdělit do několika skupin. Houby žijící v asociaci s ovocnými plodinami mohou vykazovat znaky parazitů, endofytů, mutualistů či saprotrofů. Ale zařazení každého druhu houby do některé z těchto kategorií je poměrně obtížné, protože se vztah mezi konkrétní houbou a rostlinou může během života měnit.

Asi nejlépe prozkoumané jsou houby parazitické – fytopatogenní, které způsobují onemocnění a snižují tak výnosy ovocných plodin. Je jich známo velké množství a cílem této práce není podat přehled fytopatogenních hub všech ovocných dřevin. Nejenže by byl takový seznam příliš rozsáhlý, ale tato práce je zaměřena hlavně na houby endofytické, které ještě nejsou v takové míře probádané. Budou proto představeni pouze původci nejdůležitějších chorob jaderovin, což jsou nejčastější hostitelé zástupců rodu *Neofabraea*.

Endofytické houby jsou naopak poměrně opomíjené. Přestože v posledních letech probíhá výzkum endofytické mykobioty mnoha rostlin, o endofytech ovocných plodin je toho známo stále velmi málo. Studie se zaměřují především na traviny a volně rostoucí jehličnaté a listnaté dřeviny, z hospodářsky významných plodin jsou to např. rýže, pšenice nebo kukuřice (Novotný 2007).

3.1 Endofytické houby

Vymezení pojmu endofyt není jednotné. De Bary (1866 podle Petrini 1986) chápal endofyty jako opak epifytů. Všechny organismy žijící na povrchu hostitele nazýval epifyty, zatímco organismy žijící uvnitř rostlinného pletiva označoval jako endofyty. Hranice mezi těmito dvěma skupinami ale není vždy ostrá (Petrini 1986). Carroll (1986) vyloučil z definice endofytů houby, které způsobují choroby rostlin (patogeny) a houby, které žijí uvnitř, ale také na povrchu rostlin, jako mykorhizní houby. Definici zúžil na houby, které asymptomaticky infikují pletiva rostlin. Petrini (1991) považuje za endofyty i organismy s různě dlouhou epifytickou fází a latentní patogeny, které po jistou dobu žijí uvnitř

hostitele bez jakýchkoli projevů napadení. Tato práce se bude držet posledně jmenovaného pojetí endofytů. Většina autorů studií mykobioty ovocných dřevin totiž pokládá za endofyty všechny houby izolované z povrchově sterilizovaných částí rostlin, tedy např. i houby potenciálně patogenní, které mohou být v latentní fázi.

Endofyty ovocných dřevin jsou zkoumány z mnoha důvodů. Studium endofytů může např. pomoci objasnit kompletní životní cyklus fytopatogenních hub nebo odhalit jejich možné antagonisty. Vlivem globální změny klimatu se může měnit rozšíření a ekologie houbových druhů a některé endofytické druhy se mohou stát výraznými patogeny rostlin. Dalším důvodem pro studium endofytů je využívání specifických primerů pro detekci patogenů v rostlinách. Je nežádoucí, aby docházelo k falešným reakcím, a proto je třeba při vývoji těchto primerů zajistit negativní reakci s druhy hub, které se v rostlinách vyskytují přirozeně, tedy endofyty (Novotný 2007).

Doposud byla zkoumána endofytická mykobiota jabloně, vinné révy, třešně, borůvky, brusinky a ořešáku královského. Endofyty jabloně studovali Johnston (1994) (xylém, kůra, listy), Serdani et al. (1998) (generativní orgány v různých vývojových fázích, od poupěte po zralý plod), Camatti-Sartori et al. (2005) (listy, květy, plody), Novotný (2007) (kořeny, kmen, větve, listy), Granado et al. (2008) (uskladněné plody). Na endofyty vinné révy se zaměřili Cardinali et al. (1994) (listy), Schweigkofler et Prillinger (1997) (jednoleté až tříleté výhony), Mostert et al. (2000) (nody, internodia, listy, úponky letorostů), Esseln (1994 podle Šilhánová 2004) a Esseln et Weltzien (1996 podle Šilhánová 2004) (kořeny, kmen, větve). Endofyty třešně zkoumali Dugan et Roberts (1994) (plody v různém vývojovém stádiu), endofyty borůvky a brusinky se zabýval Petrini (1985) (listy) a endofyty ořešáku královského Zhai et al. (2009) (kmen, listy, rubina). Ostatní ovocné dřeviny z hlediska výskytu endofytů ještě nikdo nestudoval.

V následujících odstavcích budou shrnuty nejčastější endofyty izolované z jabloní a dalších ovocných dřevin. Je třeba si uvědomit, že jsou pozorovány větší či menší rozdíly ve složení společenstva hub. Ovlivňovat jej může způsob ošetřování stromů, lokalita sadu, stáří orgánu, roční období nebo odrůda ovoce.

Většina prací je zaměřena na endofytické houby nadzemních částí ovocných dřevin, především listy, květy a plody. Nejčastějšími endofyty listů jabloní jsou *Alternaria* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp., *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* spp. (Camatti-Sartori et al. 2005, Novotný 2007). Větve a kmeny jabloní osídlují houbové populace podobného složení (Novotný 2007). Změnu mykobioty generativních orgánů jabloně sledovali Serdani et al. (1998) od časného ontogenetického stádia květu až po zralý

plod. Zjistili, že houby kolonizují pletiva květu již v nejranější fázi, a našli rozdíl mezi úrovní osídlení květů dvou různých odrůd jabloní. Pupy odrůdy ‘Top Red’ vykazovaly signifikantně vyšší intenzitu kolonizace než u odrůdy ‘Granny Smith’. Statisticky významný rozdíl byl však pozorován pouze v tomto stádiu vývoje, později se rozdíly stírají. K nejhojnějším druhům hub květů a plodů patří *Acremonium* sp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. a *Epicoccum nigrum* (Serdani et al. 1998, Granado et al. 2008).

V kořenech jabloní byly nalezeny druhy *Cylindrocarpon destructans*, *Phialophora* sp., dále v menší míře *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp., *Gliocladium roseum* a *Microsphaeropsis* sp. Složení mykobioty kořenů se poměrně hodně liší od nadzemních částí, shoduje se však se skladbou endofytické mykobioty žijící např. v kořenech dubu letního (*Quercus robur* L.) a dubu zimního (*Q. petraea* (Mattuschka) Liebl.) (Novotný 2003, Novotný 2007).

Jednotlivé druhy endofytických hub ovocných dřevin mají většinou široké spektrum hostitelů a složení mykobioty ostatních ovocných plodin se podobá jabloňovému. V různých částech rostlin převažují opět *Alternaria* spp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* spp., a to v plodech třešně (Dugan et Roberts 1994) a v pletivech révy vinné (Mostert et al. 2000, Schweigkofler et Prillinger 1997).

Endofyty ořešáku královského a ořešáku černého, který se používá pouze jako podnož pro kulturní odrůdy (Blažek 2001), dosud studovali pouze Zhai et al. (2009). Izolovali celkem 60 kmenů endofytických hub s fungicidními účinky a produkcí širokého spektra antibiotik. Tato práce je však dostupná pouze v čínštině, proto je obtížné získat podrobné výsledky, např. seznam izolovaných druhů endofytů.

Skutečnost, že úroveň kolonizace pletiva hostitele stoupá s rostoucím stářím orgánu, už byla pozorována mnoha badateli (Dugan et Roberts 1994, Johnston 1994, Schweigkofler et Prillinger 1997, Mostert et al. 2000, Novotný 2007).

Někteří vědci se domnívají, že by se vybrané druhy endofytických hub daly využívat jako indikátory různých produkčních systémů. Jedná se např. o kvasinku *Sporobolomyces roseus*, která byla izolována pouze z listů pocházejících z jabloní pěstovaných ekologicky, a rod *Pichia*, zaznamenaný jen v plodech z integrované produkce (Camatti-Sartori et al. 2005). Stejně tak druhy *Colletotrichum gloeosporioides* a *Phomopsis* sp. byly izolovány pouze z jablek vypěstovaných ekologicky a *Phialophora* sp. a *Stemphylium* sp. jen z jablek z integrované produkce. Jejich závislost na typu produkčního systému však musí být ještě prověřena, neboť tyto výsledky mohou být do jisté míry způsobeny náhodou, některé z těchto hub se totiž vyskytují vzácně. Výskyt

určitých druhů hub naopak typ produkčního systému neovlivňuje, např. *Alternaria* spp. nebo *Aureobasidium pullulans* (Granado et al. 2008). Obecně jsou citlivější na typ produkčního systému vláknité houby než kvasinky (Camatti-Sartori et al. 2005, Granado et al. 2008).

Některé potenciální patogeny bývají izolovány ze zdravých ovocných dřevin. Jedná se např. právě o ty nejčastější endofyty, a to *Alternaria* spp., *Aureobasidium pullulans* a *Cladosporium* spp. Skutečnost, že jsou v pletivu rostliny přítomny patogenní houby ještě neznamená, že rostlina onemocní. Výše zmíněné houby izolované z povrchově sterilizovaných zdravých plodů třešně se v testech patogenity ukázaly být patogenními (Dugan et Roberts 1994). (Zvláštní je ale fakt, že druh *Aureobasidium pullulans* neuvádějí Ogawa et al. (1995) ani Naqvi (2004) jako patogena třešní nebo jiného ovoce.) Výsledky výzkumu potvrdily, že i když jsou jablka před sklizní osídlena potenciálně patogenní houbou rodu *Alternaria*, nedojde zdaleka u všech plodů k rozvinutí hniloby. Z toho vyplývá, že v rozvoji choroby hrají roli i jiné faktory (Serdani et al. 1998).

3.2 Vybrané houbové choroby jaderovin

3.2.1 Strupovitost jablek (apple scab)

Strupovitost jablek způsobuje houba *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. s anamorfním stádiem *Spilocaea pomi* Fr. Napadá listy a plody, případně i mladé větvičky. Na napadených listech se tvoří hnědé až olivově zelené skvrny. Poškození kutikuly znamená zvýšení transpirace a při silném napadení („sheet scab“), když je zasažena celá listová plocha, mohou listy předčasně opadávat. Skvrny na mladých plodech vypadají podobně jako ty na listech. Pod poškozenou slupkou plodů se vytváří ochranné korkové pletivo (Biggs 1990, Blažek et al. 2001, Blažek 2001).

Přezimuje na spadlém listí nebo plodech ve formě plodnic (pseudoperithecií), v nichž začátkem vegetace dozrávají dvoubuněčné žlutozelené askospory. Buňky askospory se liší svou velikostí, což dalo houbě druhové jméno. K vývoji pseudoperithecií je potřeba vlhkost a optimální teplota. Za sucha jsou askospory vymršťeny z vřeska a roznášeny větrem. Po dopadu na vlhký list mohou vyklíčit, prorůstají listovou pokožku a po uplynutí inkubační doby, jejíž délka závisí na teplotě, začnou produkovat jednobuněčné kyjovité konidie. Konidiofory jsou viditelné jako olivově zelené skvrny na listech nebo plodech. Konidie jsou splavovány vodou a mohou působit sekundární infekci (Biggs 1990, Blažek et al. 2001, Blažek 2001).

Ochrana je velmi náročná. Prevencí proti strupovitosti je odstraňování a likvidace spadaneho listí na podzim. Doporučuje se pěstování odrůd méně náchylných nebo rezistentních vůči strupovitosti. Rezistentní kultivary byly vyšlechtěny křížením s druhem *Malus floribunda* (jabloň mnohokvětá) a patří mezi ně např. podzimní odrůda 'Selená' nebo zimní odrůdy 'Florina', 'Goldstar', 'Melodie', 'Rajka', 'Resista', 'Rubinola', 'Topaz'. Dále je možné stromy chemicky ošetřovat, a to jak preventivně, tak i po napadení (Sus et al. 2000, Blažek et al. 2001, Blažek 2001).

Zvláštním typem strupovitosti je skládková strupovitost, která se projeví až během uskladnění jablek. Na napadených plodech se tvoří malé skvrnky, které se postupně zvětšují až na 2-5 mm. Tato jablka více transpirují a jejich slupka rychleji vadne (Blažek et al. 2001, Blažek 2001).

3.2.2 Strupovitost hrušní (pear scab)

Původcem této choroby je *Venturia pirina* Aderh. s anamorfním stádiem *Fusicladium pyrorum* (Lib.) Fuckel. Napadá, na rozdíl od *V. inaequalis*, také mladé větve a při silném napadení i větve starší. Na napadených orgánech se tvoří sazovité hnědočerné až šedočerné skvrny, jsou obvykle tmavší, menší a ostřeji ohraničené než u strupovitosti jabloně. Silně postižené listy, květy a plody opadávají. Starší plody jsou deformovány a praskají a následně jsou napadány hnilobami. Na letorostech vznikají šedohnědé skvrny, dochází k odumírání postižených pletiv a vzniká nápadná drsnost kůry (Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

Houba přezimuje ve formě mycelia na větvích, kde vyrůstají konidiofory s konidiemi, a ve spadaneho listí, kde se vyvíjejí plodnice (pseudoperithecia). Konidie i askospory jsou zdrojem primární infekce, k níž dochází již těsně po vyrašení, konidie jsou často přítomny dříve než askospory. Ekologie *V. pirina* a ochrana proti této houbě se podobá *V. inaequalis* (Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

3.2.3 Padlí jabloňové (apple mildew)

Podosphaera leucotricha (Ellis & Everh.) E.S. Salmon s anamorfním stádiem *Oidium farinosum* Cooke vytváří rozsáhlé bílé povlaky na letorostech, listech, květech a mladých plodech. Povlaky jsou tvořené myceliem s konidiofory. Vedou k redukci růstu a k deformacím až zasychání letorostů i listů. Napadené květy jsou menší a morfologicky pozměněné, korunní a kališní lístky jsou ztlustlé, korunní lístky zelenavé, tyčinky srůstají. Na napadených plodech lze pozorovat nápadnou síťovitou rzivost. Při sekundární infekci

vyvinutých listů vznikají světle zelené neohraničené skvrny a dochází k mírné deformaci listů (Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

Přezimuje jako mycelium v listových a květních pupenech a již při rašení napadá příslušné orgány. Na nich se pak vyvíjejí konidiofory s konidiemi, které jsou zdrojem sekundární infekce. V závěru léta se v myceliálních porostech tvoří tmavá, kulatá, 0,1 mm velká erysiphální perithecia s jedním vřeckem. Pro přezimování a šíření parazita nemají plodnice podstatný význam (Blažek 2001, Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

Nepřímou ochranou proti padlí je odstraňování primárně napadených listových růžic. Důležitou součástí prevence je výběr vhodného stanoviště, vyrovnaná výživa (zejména nepřehnojování dusíkem) apod., což vede k optimalizaci růstu a snížení vnímavosti k infekci. Jednotlivé odrůdy jabloní se velmi liší citlivostí k onemocnění. Mezi nejnáchylnější patří 'Idared', 'Jonathan', 'Coxova reneta' a 'Průsvitné letní', naopak odolné jsou 'Starkrimson Delicious', 'Lord Lambourne' a 'Julia'. Chemická ochrana je nezbytná především u náchylných odrůd a vyžaduje pravidelnou aplikaci fungicidů. Převážná část fungicidů používaných proti strupovitosti jabloní účinkuje také na padlí jabloňové (Blažek 2001, Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

3.2.4 Septorióza hrušní (leaf spot of pear)

Někdy bývá označována také jako bílá nebo šedá skvrnitost. Původcem je *Mycosphaerella pyri* (Auersw.) Boerema s anamorfním stádiem *Septoria pyricola* Desm. Choroba se projevuje tvorbou hnědavých skvrnek na listech, později nekrotizují a uprostřed bělavě šednou. Listy mohou při silném poškození opadávat. Houba přezimuje ve spadaném listí, kde se v zimě tvoří plodničky s dvoubuněčnými askosporami, které způsobují primární infekci. Zdrojem sekundární infekce jsou konidie vznikající v pyknidách na obou stranách listů. Ochranným opatřením je likvidace spadaného listí. Výskyt septoriózy je zanedbatelný, pokud se hrušeň ošetřuje proti strupovitosti (Blažek et al. 2001, Lánský et al. 2005).

3.2.5 Rzivost hrušně (pear rust)

Gymnosporangium sabinae (Dicks.) Wint. je dvoubuněčná rez. Jejím primárním (hlavním) hostitelem je *Juniperus* spp. (jalovec), především *J. chinensis* L. (j. čínský), *J. × media* (j. prostřední) a méně často *J. sabina* L. (j. chvojka). Sekundárním hostitelem (mezihostitelem) je *Pyrus* spp. (hrušeň), především *P. communis* L. (h. obecná) a *P. pyrausta* (L.) Burgsdorf (h. polnička) (Juroch 2006, jména podle Kubát et al. 2002).

Životní cyklus *G. sabinae* je velmi složitý. Na jalovci se v telích tvoří žlutavé až tmavě červenohnědé teliospory – probazidie. Po karyogamii a následném redukčním dělení z nich vyklíčí čtyřbuněčné bazidie – metabazidie. Bazidiospory jsou přenášeny větrem a za vhodných podmínek klíčí v hyfu a pronikají do pletiv hrušně. Primární (haploidní) mycelium prorůstá mezibuněčné prostory hostitele a vytváří haustoria pro čerpání živin z buněk. Později vznikají na horní straně listů spermogonia (v nich se diferencují spermacie – samčí gamety) a receptivní hyfy. Pro nalákání hmyzu, který přenáší spermacie, produkuje *G. sabinae* čirou nasládlou tekutinu, zvanou nektar. Po přenesení spermacie na receptivní hyfu dochází k plasmogamii a vzniká dvoujaderná buňka, ze které klíčí sekundární (dikaryotické) mycelium. Na něm se později na spodní straně listů tvoří jarní ložiska výtrusů typu roestelia, jarní výtrusy jsou přenášeny pomocí vzdušných proudů na jalovec. *G. sabinae* neprodukuje urediospory, jedná se o mikrocyclický druh (Juroch 2006).

Rez napadá především čepele listů, při silné infekci i řapíky, mladé letorosty a plody. Na svrchní straně listů se koncem května a v červnu objevují oranžové skvrny s výrazným červeným lemováním a na nich se později vyvíjejí oranžově červená, později černavá, kuželovitá spermogonia. Jsou uspořádána většinou koncentricky uprostřed skvrn, méně často tvoří skupiny protáhlého tvaru. Na spodní straně listu, v místech skvrn, vznikají nádorovité útvary. Jejich povrch je zpočátku hladký, později praská a pletiva epidermis nekrotizují. Od poloviny srpna do září se na vrcholech nádorů objevují nápadná roestelia. Silně napadené listy mohou předčasně opadávat (Juroch 2006).

Preventivním opatřením proti rzivosti hrušně je prostorová izolace hrušní a náchylných druhů jalovců. Doporučuje se minimální vzdálenost 150-200 m, spolehlivá 500 m a více. Vhodné je pěstování odolnějších druhů jalovců, např. *Juniperus communis* L. (j. obecný), *J. squamata* D. Don (j. šupinatý) nebo *J. horizontalis* Moench (j. poléhavý), a odolnějších odrůd hrušní, např. Červencová, Boscova či Hardyho. Přímá ochrana zahrnuje mechanické odstranění silně napadených rostlin jalovců nebo jejich částí a chemická ošetření, především hrušní, ale lze ošetřovat i jalovce (Juroch 2006).

3.2.6 Moniliová hniloba (brown rot)

Vyvolávají ji houby rodu *Monilinia*. Druh *M. fructigena* Honey s anamorfním stádiem *Monilia fructigena* (Pers.) Pers. napadá především jádroviny (Lánský et al. 2005). Vzácně se v Evropě vyskytuje také druh *M. fructicola* (G. Winter) Honey s anamorfou *Monilia fructicola* L.R. Batra, který je v Evropě nepůvodní a je uveden na seznamu

karanténních škodlivých organismů EPPO (Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin) (Anonymus 2009b). Druh *M. fructicola* napadá jádroviny i peckoviny (Šindelková 2008). Na ovocných dřevinách páchá škody také druh *M. laxa* (Aderh. & Ruhland) Honey s anamorfou *Monilia laxa* (Ehrenb.) Sacc. & Voglino, který napadá především peckoviny a způsobuje hnilobu plodů a moniliovou spálu (úžeh) (Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

Patogen poškozuje hlavně plody, méně květy a větvičky. Na plodech se tvoří rychle se rozšiřující hnědé skvrny. Dužnina v místě napadení rovněž hnědne, měkne a hnije. Pod pokožkou se vytvářejí sporodochia, pokožka praská a na povrchu plodů se objevují svazky konidioforů, které se jeví jako krémově bělavé, později hnědavé polštářky uspořádané v koncentrických kruzích. Některé plody zůstávají viset na stromě a na těchto mumifikovaných plodech se na jaře také objevují kupky konidií, které jsou zdrojem primární i sekundární infekce. Spory jsou přenášeny větrem, hmyzem či deštěm. Nákaza vniká do plodů poraněním způsobeným např. hmyzem nebo krupobitím. Větévky jsou nejčastěji infikovány myceliem prorůstajícím z plodu, přímá infekce je možná pouze při poranění. Ve skladu vyvolává houba tzv. černou hnilobu plodů. Ovoce je tmavohnědé až černé, houbovitě, bez sporulace a má suchý, kožovitý povrch, jeho dužnina je rovněž černohnědá. Někdy se ve skladu objevuje hnědá hniloba, při níž se vytvářejí kupky konidií v soustředných kruzích. Prevencí je správná agrotechnika, odstraňování mumifikovaných plodů a ochrana před hmyzem, chemickou ochranu vyžadují výsadby neošetřené proti strupovitosti (Dvořák 1987, Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008, Šindelková 2008).

3.2.7 Peniciliová hniloba (blue mould)

Peniciliovou neboli modrou hnilobu způsobují houby rodu *Penicillium*, především druh *P. expansum* Link. Je to nejčastější skládková choroba jablek a hrušek, spory patogena jsou všudypřítomné. K infekci ovoce dochází především při poranění, výjimečně přes lenticely. Choroba se ve skladu šíří z napadených na zdravé plody, proto se musí ovoce pravidelně kontrolovat a hnilící kusy odstraňovat. Onemocnění se projevuje tvorbou světlehnědých, okrouhlých, mírně propadlých skvrn na slupce plodů, dužnina pod postiženými místy měkne a kašovatí. Na povrchu skvrn se tvoří modrozelené kupičky konidií. Patogen může produkovat mykotoxin patulin. Výskyt hniloby se dá omezit uskladněním dobře vyzrálého a nepoškozeného ovoce a zajištěním optimálních skladovacích podmínek (Lánský et al. 2005, Hluchý et al. 2008).

3.2.8 Antraknóza (anthracnose canker) a rakovina kůry (perennial canker)

Za antraknózu kůry je zodpovědný druh *Neofabraea malicorticis* H. S. Jacks. s anamorfou *Cryptosporiopsis curvispora* (Peck) Gremmen a za rakovinu kůry *N. perennans* Kienholz s anamorfou *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. Oba druhy jsou si morfologicky velmi podobné, což vedlo dokonce k tomu, že v Evropě byly považovány za jediný druh (Verkley 1999). Liší se ale svou citlivostí k fungicidům a pro účinnou chemickou ochranu výsadby je proto důležité oba druhy od sebe správně rozpoznat. Rozdíl je také ve způsobu infekce hostitele. *N. perennans* se dostává do pletiva hostitele ránou různého původu, např. po řezu, zatímco *N. malicorticis* je schopna napadnout rostlinu přes zdravou kůru, nejčastěji lenticelami (Kienholz 1939).

Antraknóza kůry se projevuje tvorbou nejprve malých kruhových skvrn, které mohou být za vlhka načervenalé až nachové. Postupně se zvětšují a jeví se jako eliptické, propadlé, oranžové až hnědé oblasti na kůře. Mezi zdravým a napadeným pletivem může docházet k trhlinám. Na nekrotických částech se objevují krémově zbarvené acervuly. Později se loupe kůra a odhaluje se lýko. Jen ojediněle se nekrotická skvrna rozšiřuje ještě v dalším roce. Houba přezimuje jako mycelium a ve formě konidií. Nové léze se tvoří na podzim a vyvíjejí se následující jaro, konečné velikosti dosahují v květnu. První acervuly se objevují koncem léta a na podzim asi rok po napadení. Sporulace může pokračovat i v dalších letech na mrtvé kůře (Grove 1990).

Rakovina kůry se také projevuje vznikem nekrotických skvrn. V prvním roce jsou oválné, propadlé, oranžové, fialové nebo hnědé. Napadená dřevina se snaží izolovat postiženou část od zdravé tvorbou kalusového pletiva, na němž často saje vlnatka krvavá (*Eriosoma lanigerum* Hausmann). Po několika letech má léze podobu koncentricky uspořádaných kalusových kruhů. Černé acervuly se tvoří pod epidermis jednoletých skvrn. Houba přezimuje ve formě mycelia a konidií tvořených na nekrotických skvrnách a spadáných plodech. Nekróza se rozrůstá, protože se její okraj každoročně infikuje konidiemi. V důsledku sání vlnatky krvavé na kalusovém pletivu dochází ke vzniku zduřenin, které jsou citlivější k nízkým teplotám a praskají. Těmito ranami se konidie dostávají do nenapadeného pletiva (Kienholz 1939, Grove 1990).

Konidie produkované v nekrotických oblastech jsou zdrojem infekce pro rozvoj hnědé kruhové hniloby na plodech (Grove 1990).

Teleomorfní stádium obou druhů patogenů se tvoří vzácně (Grove 1990).

Oba druhy mají shodné hostitele. Mohou napadat jabloň (*Malus sylvestris* Mill., *M. baccata* (L.) Borkh., *M. rivularis* Roemer), hrušeň (*Pyrus communis* L.), kdouloň (*Cydonia oblonga* Mill.), muchovník (*Amelanchier pallida* Gr.), broskvoň (*Prunus persica* (L.) Batsch.), meruňku (*P. armeniaca* L.), třešeň (*P. avium* L.), slivoň (*P. sp.*), kdoulovec (*Chaenomeles* sp.), hloh (*Crataegus* sp.) a jeřáb (*Sorbus* spp.). Na peckovinách se však po inokulaci nevytvoří typické příznaky známé z jaderovin (Kienholz 1939).

Také druh *N. alba* (E. J. Guthrie) Verkley, s anamorfou *Phlyctema vagabunda* Desm. způsobuje nekrózy, na nichž jsou produkovány konidie, které rovněž slouží jako zdroj infekce kruhové hnědé hniloby plodů (Verkley 1999).

3.2.9 Kruhová hnědá hniloba (bull's-eye rot)

Tato choroba někdy bývá označována jako gloeosporiová nebo též hořká hniloba (Kloutvorová et Kupková 2007). Nicméně hořká hniloba (bitter rot) je onemocnění způsobené druhy *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk s anamorfou *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. a *Glomerella acutata* Guerber & J.C. Correll s anamorfou *Colletotrichum acutatum* J.H. Simonds (Sutton 1990, Guerber et Correll 2001).

V České republice byl dosud zaznamenán pouze jeden z jejích původců, a to druh *Neofabraea alba* s anamorfním stádiem *Phlyctema vagabunda* (Novotný et al. 2009). Jako další druhy působící toto onemocnění se uvádějí *N. malicorticis* s anamorfou *Cryptosporiopsis curvispora*, *N. perrenans* s anamorfou *C. perennans* a *N. sp.* s anamorfou *C. kienholzii* (de Jong et al. 2001).

Onemocnění se projevuje většinou až ve druhé polovině skladovacího období. Na plodech se tvoří ploché nebo mírně propadlé ostře ohraničené kruhové skvrny, nejčastěji hnědé se světlehnědým středem, 0,5-3 cm velké. Dužnina v místě napadení rovněž hnědne, kašovatí a je poměrně výrazně ohraničena od zdravé části. Na starších lézích se objevují acervuly s krémově zbarvenou masou konidií. Na skvrnách vyvolaných druhy *N. perennans* a *C. kienholzii* lze často pozorovat povrchové mycelium, ale u *N. alba* nebylo pozorováno (Spotts 1990, Lánský et al. 2005, Spotts et al. 2009).

Ovoce se může nakazit po celou dobu vývoje plodu, ale infekce zůstává latentní po mnoho měsíců a projeví se teprve ve skladu, většinou až po pátém měsíci od sklizně. Zdrojem infekce jsou konidie. Ty jsou u jabloní produkovány v nekrózách větví vyvolaných patogenem, zatímco u hrušní nebyla indukce nekróz pozorována, houba kolonizuje pouze poraněnou nebo mrtvou kůru. Konidie jsou splavovány deštěm

a dostávají se tak na vyvíjecí se plody. V letech s vyššími úhrny srážek během období sklizně lze pozorovat vyšší výskyt kruhové hnědé hniloby (Spotts 1990). Houba přezimuje jako mycelium a ve formě konidií v rakovinných útvarech větví, na zbytcích plodů zůstávajících přes zimu viset na stromech, na opadaném ovoci na zemi i na jizvách po opadlém listí (Lánský et al. 2005).

Ochrana před kruhovou hnědou hnilobou spočívá v odstraňování napadených větviček stromů a v aplikaci fungicidů (Spotts 1990). Chemická ochrana však není jednoduchá, neboť všechny druhy *Neofabraea* nereagují na vybraný fungicid stejně. Aby byla ochrana efektivní, je potřeba správně identifikovat původce choroby a podle toho zvolit vhodný fungicid. Bylo ale nalezeno několik fungicidů, které poskytují dostatečnou ochranu proti všem čtyřem druhům, např. thiabendazol nebo benzimidazol (Spotts et al. 2009). Rozvoj hniloby se dá omezit také vytvořením správných skladovacích podmínek, především nízká teplota a nízký obsah kyslíku může zpomalit vývoj choroby (Spotts 1990). Houba se ale někdy šíří i za optimálních skladovacích podmínek, protože nemá vyhraněné nároky na teplotu (Hluchý et al. 2008).

Výskyt choroby ovlivňuje ještě mnoho dalších faktorů. Jde např. o formu závlahy. Zavlažování postřikem stromů zvyšuje incidenci hnědé kruhové hniloby, oproti zavlažování pod stromy. Postřik stromů vlastně nahrazuje roli dešťových srážek v uvolnění a rozptylování konidií. Velmi důležité pro předcházení onemocnění je správné načasování sklizně. Konidie se v nekrotických skvrnách na kůře větviček tvoří po celé vegetační období, ale na konci léta a na podzim vrcholí. V tomto období se také zvyšuje pravděpodobnost dešťových srážek, které zajišťují disperzi konidií a šíření patogena. Z toho vyplývá, že postupně stoupá riziko infekce. Navíc čím je ovoce zralejší, tím je náchylnější k onemocnění, proto by se mělo sklídit včas, přezrálé ovoce vykazuje vyšší výskyt skládkových chorob (Henriquez et al. 2008).

Jednotlivé odrůdy jabloní se liší náchylností ke kruhové hnědé hnilobě. Např. odrůda 'Topaz' trpí touto chorobou velmi často a bez použití fungicidů může být během období skladování zničena téměř celá úroda. Chemická ochrana snižuje výskyt onemocnění, a to dvakrát až čtyřikrát, v závislosti na odrůdě (Blažek et al. 2006). Odolnější odrůdy vůči skládkovým chorobám obecně se některými svými charakteristikami odlišují od těch náchylnějších. Odolnější kultivary vykazují vyšší obsah fenolických látek, nižší hodnoty pH šťávy v plodech, přirozený vyšší obsah vápníku, větší tloušťku a pevnost slupky a nižší tvorbu etylenu. Obsah vápníku a produkce etylenu ovlivňuje výskyt skládkových chorob pravděpodobně pouze nepřímo. Etylen urychluje

zrání ovoce a tím zkracuje skladovací dobu. Plody s vyšším obsahem vápníku jsou pevnější a produkují méně etylenu. Na základě vyhodnocení těchto vybraných vlastností byl navržen ideotyp jabloně, který by se mohl uplatnit ve šlechtění odrůd odolných vůči skládkovým chorobám (Blažek et al. 2007).

4 Rod *Neofabraea*

Rod *Neofabraea* H. S. Jacks. je podle současného systému řazen do oddělení *Ascomycota*, pododdělení *Pezizomycotina*, třídy *Leotiomycetes*, řádu *Helotiales*, čeledi *Dermateaceae* (Lumbsch et Huhndorf 2007, Kirk et al. 2008).

Rodové jméno *Neofabraea* poprvé použil Jackson v roce 1913 pro nově objevenou teleomorfou houby tehdy známé jako *Gloeosporium malicorticis* Cordley (dnes *Cryptosporiopsis curvispora* (Peck) Gremmen), způsobující antraknózu jabloní. Dalším zástupcem tohoto rodu se stal v roce 1930 druh popsáný Jørgensenem, *N. corticola* (dnes *Pezicula corticola*), který je také původcem onemocnění kůry jabloní a hrušní. Roku 1932 byly Nannfeldtem zařazeny oba druhy do rodu *Pezicula* a jméno *Neofabraea* se stalo synonymem jména *Pezicula*. Někteří fytopatologové však nepřestali jméno *Neofabraea* používat (Verkley 1999).

Verkley (1999) navrhl na základě studia morfologie taxonomické změny v rámci rodu *Pezicula* a studium fylogenetických vztahů mezi příbuznými rody *Pezicula*, *Dermea* a *Neofabraea* tyto změny potvrdilo. Některé taxony do té doby řazené do rodu *Pezicula*, tvoří samostatné vývojové linie a byly tedy z tohoto rodu vyčleněny. Byl obnoven rod *Neofabraea*, do něhož se již nevrátil druh *P. corticola* (C.A. Jørg.) Nannf. (Abeln et al. 2000). Vyřazen byl z tohoto rodu také druh s původním jménem *P. alnicola*. Ve srovnání s ostatními zástupci má extrémně tlusté stěny buněk stromatu. Vzhledem k této výrazné morfologické odlišnosti byl ustaven nový rod, jehož typovým druhem se stal druh *Scleropezicula alnicola* (J.W. Groves) Verkley (Verkley 1999) a molekulárně-genetické metody prokázaly, že do rodu *Pezicula* skutečně nepatří (Abeln et al. 2000). Součástí rodu *Pezicula* se stal druh *Ocellaria ocellata* (Pers.: Fr.) J. Schroet. Některými vědci byl sice do tohoto rodu zařazen již v polovině 20. století a bylo pro něj navrženo jméno *P. ocellata*, ale přesto se i nadále často používalo označení samostatného rodu. Výsledky fylogenetické studie potvrdily příslušnost k rodu *Pezicula* a jeho současné platné pojmenování zní *P. ocellata* (Pers.: Fr.) Seaver. (Abeln et al. 2000).

Rody *Neofabraea* a *Pezicula* se od sebe liší nejen na molekulárně-genetické úrovni, ale rozdíly lze nalézt také v životním cyklu, ekologii nebo morfologii. Zástupci rodu

Neofabraea jsou většinou patogeny, především jabloní a hrušní, a vyskytují se také saprotrófně. Druhy *Pezicula* jsou naproti tomu nejčastěji neškodné endofyty, ale existuje několik výjimek, např. některé kmeny *P. cinnamomea* (DC.: Fr.) Sacc. a *P. sporulosa* Verkley mohou způsobovat nekrózy kůry škodlivé zejména pro mladé stromky a druh *P. corticola* je znám jako původce onemocnění kůry jabloní a hrušní. Další odlišností je frekvence tvorby teleomorfy. Teleomorfa u rodu *Pezicula* bývá pozorována často, zatímco u rodu *Neofabraea* jen zřídka, pravděpodobně pro houbu není pohlavní rozmnožování nepostradatelné. Rod *Neofabraea* je unikátní tvorbou apothecií s nedokonale vyvinutým excipulem, apothecia mohou splývat v neurčité komplexy a někdy obsahují i konidiofory. Další rozdíl lze nalézt v typu konidiogenních buněk anamorfních stádií. Konidiogenní buňky u rodu *Pezicula* jsou determinátní a fialidické nebo indeterminátní a perkurentně proliferující. Anamorfy rodu *Neofabraea* mají konidiogenezi výhradně fialidickou (Verkley 1999).

Zástupci rodu *Neofabraea* tvoří přisedlá nebo krátce stopkatá apothecia, která jsou kruhová, eliptická či nepravidelná, světle šedá nebo hnědožlutá, tělová až světle načervenalá či hnědá, 0,2-2 mm velká. Vyrůstají jednotlivě nebo ve skupinách z bazálního stromatu. Stroma se vyvíjí mezi buňkami spodní vrstvy kůry, většinou je zanořené. Medulární excipulum je hyalinní, ektální excipulum obvykle chybí. Vřečka jsou inoperkulátní, cylindricky-kyjovitá, 8-sporická, zužují se do různě dlouhé stopky, amyloidita vřecek je IKI+ nebo -, Mlz+ nebo -. Askospory jsou protáhle elipsoidní nebo vřetenovité, přímé nebo zahnuté, jednobuněčné, tenkostěnné, později s 1-3(-6) přehrádkami, někdy muriformní. Paryfýzy jsou četné, filiformní, přehrádkované, tupé, jednoduché nebo větvené, hyalinní (Verkley 1999).

Konidiomata jsou stromatická, acervulární, plochá až pulvinátní, u druhu *N. alba* eustromatická, s jednou nebo více dutinami, později se otevírají a stávají se acervuloidními nebo pulvinátními. Masa konidií je šedavá, narůžovělá nebo nahnědlá. Stěna konidiomatu je hyalinní až světle hnědá. Makrokonidiogenní buňky jsou determinátní, fialidické, cylindrické až úzce lahvicovité a vznikají z vnitřních buněk konidiomatu nebo jsou integrovány v jednoduchých nebo větvených, hladkých, hyalinních, akrogenních nebo akropleurogenních konidioforech. Makrokonidie jsou cylindricky-vřetenovité, alantoidní až elipsoidní, přímé nebo častěji lehce nebo silně zakřivené, jednobuněčné, hyalinní, tenkostěnné, většinou naplněné olejovými krůpějemi, později se tvoří 1-2(-3) přehrádky a stěna hnědne. Mikrokonidiogenní buňky nejsou vždy přítomné, jsou determinátní, fialidické, úzce lahvicovité, hyalinní, samostatné nebo na stejných nebo častěji oddělených

konidioforech. Mikrokonidie mohou chybět, jsou cylindrické, jednobuněčné, hyalinní, tenkostěnné, s trochu granulárním obsahem (Verkley 1999).

4.1 *Neofabraea alba* (E. J. Guthrie) Verkley

Teleomorfu *N. alba* poprvé popsal Guthrie (1959), ovšem v rámci rodu *Pezicula*. Do té doby byla tato houba známa pouze jako anamorfa *Gloeosporium album* Osterw. (dnes *Phlyctema vagabunda* Desm.). Do rodu *Neofabraea* ji přeřadil Verkley (1999).

V literatuře se také někdy objevuje nesprávné označení anamorfy – *Phlyctaena vagabunda*. Tuto podobu použil Montagne v roce 1949, kdy provedl pravopisnou změnu. Platná je však původní podoba jména - *Phlyctema vagabunda* – navržená Desmazièrem roku 1847 (Verkley 1999).

N. alba se vyznačuje šedými nebo žlutohnědými, přisedlými, kruhovými či nepravidelnými, až 1 mm velkými apothecii vyrůstajícími z acervuloidního stromatu. Apothecia mohou obsahovat i konidiofory. Vřečka jsou cylindricky-kyjovitá, 8-sporická, 125-150 × 13-24 µm velká, askoapikální aparát je barvitelný jódem. Askospory jsou hyalinní, přímé nebo lehce zakřivené, 20-30 × 7-10 µm velké, zpočátku neseptované, později se vytváří 3-5(6) přehrádek. Plodnice obsahuje četné parafýzy, které jsou hyalinní, filiformní, rozvětvené, přehrádkované, až 3 µm široké (Verkley 1999).

Konidiomata jsou eustromatická, acervuloidní či nepravidelná pulvinátní, o průměru až 0,8 mm, zpočátku zanořená, později prorážejí kůru. V *in vitro* podmínkách je tvoří pouze některé kmeny, mají průměr 80-300 µm a slučují se do skupin velkých až 15 mm. Konidiogenní buňky jsou samostatné nebo na akrogenních, případně akropleurogenních konidioforech dlouhých 18-35(-50) (v *in vitro* až 80) µm. Konidie tvoří šedou až světlehnědou masu. Makrokonidie jsou cylindrické až vřetenovitě-alantoidní, jednobuněčné, 14-30 × 2-4 µm velké a v *in vitro* podmínkách se mohou na samostatných konidioforech tvořit také mikrokonidie, které jsou cylindrické, zpravidla silně zahnuté, hyalinní, jednobuněčné, 15-18 × 0,5-1 µm velké (Verkley 1999).

N. alba vytváří kolonie s pravidelným okrajem, po 14 dnech mají průměr 40-50 mm. Submerzní mycelium je dohněda zbarvené, vzdušné mycelium je obvykle rozsáhlé, zpočátku bělavé, pak růžově žlutohnědé až skořicové, reverz má na V-8 agaru červený nádech, na malt extrakt, třešňovém a kukuřičném agaru je šafránový až oranžový (Verkley 1999).

Druh *N. alba* je rozšířen v Severní Americe, Evropě, Jižní Africe, Austrálii, na Novém Zélandu a Tasmánii. Může žít paraziticky nebo saprotrófně a možná také endofyticky. Je znám jako původce antraknózy listů a větviček a kruhové hnědé hniloby plodů jabloní a hrušní (Verkley 1999) a vyvolává onemocnění jasanu (*Fraxinus* spp.) nazývané „coin canker“ v Severní Americe. Napadá některé pěstované kultivary druhů *Fraxinus pennsylvanica* Marshall (j. pensylvánský) a *F. americana* L. (j. americký). Kmen *N. alba* izolovaný z jasanu je schopen infikovat i pletiva jabloně (Rossman et al. 2002, Putnam et Adams 2005). Jako neškodný saprotof byl tento druh nalezen na mrtvé kůře jabloně (*Malus* sp.) a olivovníku evropského (*Olea europaea*). Znám je také z brslenu (*Euonymus* sp.), ostružiníku (*Rubus* sp.), bezu (*Sambucus* sp.), oměje (*Aconitum* sp.) a turanu (*Erigeron* sp.) (Verkley 1999). Endofytický způsob života dosud nebyl prokázán. Při studiu endofytické mykobioty jabloní nebyl druh *N. alba* izolován, z čehož vyplývá, že zřejmě nepatří mezi běžné endofyty jabloní (Novotný 2007).

4.2 *Neofabraea krawtzevii* (Petr.) Verkley

Druh *N. krawtzevii* je znám také pod jménem *N. populi* G. E. Thompson. Anamorfoou je *Cryptosporiopsis* sp. Vyskytuje se převážně saprotrófně na mrtvé kůře topolu (*Populus* spp.), ale může, zvláště u mladých stromů, způsobovat nekrózu kůry. Je rozšířen v Severní Americe, severní Evropě, na Sibiři a v Japonsku (Verkley 1999).

Apothecia druhu *N. krawtzevii* vyrůstají jednotlivě nebo po 2-3(4) na bazálním stromatu, jsou přisedlá, kruhová až eliptická, za vlhka světle načervenalé hnědá, až 2 mm velká, za sucha tmavší, 0,5 až 1,3 mm velká. Vřečka jsou cylindrická až kyjovitá, 8-sporická, 70-115 × 9-13,5 µm, askoapikální aparát je barvitelný jódem. Askospory jsou tenkostěnné, hyalinní, přímé nebo lehce zakřivené, 14-20 × 4-5 µm, později se stěny zbarvují dožluta nebo dohněda a vytvářejí se až 3 přehrádky. Parafýzy jsou četné, filiformní, septované, jednoduché nebo rozvětvené, 1,5-2,5 µm široké, hyalinní (Verkley 1999).

Konidiomata jsou stromatická, acervulární, kruhová nebo nepravidelná, o průměru 0,5-1,5 mm, konidiální masa je narůžovělá. Konidiogenní buňky jsou determinátní, fialidické, 12-20 × 3,5-4,5 µm velké, na jednoduchých či rozvětvených, přehrádkovaných, hyalinních, akrogenních konidioforech o rozměrech 25-35 × 4 µm. Makrokonidie jsou cylindricky-vřetenovité až alantoidní, zakřivené, neseptované, tenkostěnné, hyalinní, postupně hnědé, s 1-3 přehrádkami (Verkley 1999).

Na ovesném agaru vytváří velmi málo vzdušného mycelia, agar zbarvuje tmavě červenohnědě, konidie jsou v narůžovělé mase. Bližší popis *in vitro* kultury není k dispozici (Verkley 1999).

4.3 *Neofabraea malicorticis* H. S. Jacks.

Neofabraea malicorticis je typovým druhem rodu *Neofabraea*. Anamorfou je *Cryptosporiopsis curvispora* (Peck) Gremmen (Verkley 1999).

Apothecia vyrůstají z acervulárního stromatu z předešlého roku, jednotlivě nebo ve skupinách, jsou přisedlá či krátce stopkatá, kruhová, o průměru 0,5-1,0 mm, často splývají v neurčité rozsáhlejší komplexy, zbarvení je našedlé, tělové nebo hnědavé. Vřečka jsou cylindrická až kyjovitá, 75-150 × 10-20 µm velká, 8-sporická, amyloidita vřecek je J+ nebo J-. Askospory jsou protáhle elipsoidní, přímé nebo zakřivené, neseptované, tenkostěnné a hyalinní, později stěny tloustnou a hnědnou a vytváří se 1-3(-5) přehrádek. Za nepříznivých podmínek pro uvolnění askospor, tvoří askospory přehrádky a klíčí ve vřecku. Hyfa pronikne stěnou vřecka a vyvinou se fialidy, které tvoří typické konidie z povrchu hymenia. Parafýzy jsou četné, filiformní, přehrádkované, jednoduché či rozvětvené, hyalinní, 1,8-2,5 µm široké (Verkley 1999).

Konidiomata se často vyvíjejí v charakteristických nekrotázách kůry (antraknóza), jsou stromatická, acervulární, kruhová nebo nepravidelná, mnohdy splývají, za vlhka jsou pulvinátní, za sucha plochá, mají průměr 0,2-1,2 mm, masa konidií je krémově zbarvená. Makrokonidiogenní buňky jsou determinátní, fialidické, cylindrické, 10-32 × 3,5-5,5 µm velké, samostatné nebo na jednoduchých nebo větvených, přehrádkovaných, akrogenních nebo akropleurogenních konidioforech velkých 18-45 × 3,5-4,5 µm. Makrokonidie jsou variabilní, slabě nebo silně zakřivené (srpovité až ve tvaru U), vzácně přímé, jednobuněčné, později často s 1-3 přehrádkami, hyalinní, tenkostěnné, s granulárním obsahem nebo s různým množstvím olejových krůpějí. V *in vitro* podmínkách se mohou tvořit také cylindrické, hyalinní, přímé nebo slabě zahnuté, 5-8(-13) × 1-1,5(-2) µm velké mikrokonidie. V *in vitro* podmínkách mohou konidiomata chybět a konidiofory se tvoří na povrchových hyfách. Masa konidií je v tomto případě bezbarvá až tělová, konidie mají přechodnou formu mezi makrokonidiemi a mikrokonidiemi (Verkley 1999).

Na sladinovém agaru tvoří kolonie s dobře vyvinutým vzdušným myceliem, jsou šedé, lokálně tělově až korálově zbarvené. Submerzní mycelium má tmavý střed, který je

lemován koncentrickými červenými a okrovými zónami, okraj je růžově žlutohnědý. Reverz je krvavě červený až oranžovožlutý (Verkley 1999).

Je původcem antraknózy kůry jabloní, hrušní, kdouloní, broskvoní, meruněk a dalších zástupců rodu *Prunus*. Napadá také kdoulevec japonský (*Chaenomeles japonica* (Thunb.) Spach.), hloh (*Crataegus* spp.), jeřáb (*Sorbus* spp.) nebo muchovník (*Amelanchier* spp.) (Verkley 1999). Dalším hostitelem je pravděpodobně růže (*Rosa* spp.), ale tato skutečnost zatím nebyla ověřena podle Kochových postulátů (de Jong et al. 2001). Způsobuje také kruhovou hnědou hnilobu plodů. Byl zaznamenán v Severní Americe, v některých zemích Evropy (Dánsko, Nizozemí, Portugalsko) a na Novém Zélandu (Verkley 1999).

4.4 *Neofabraea perennans* Kienholz

Anamorfní stádium tohoto druhu je *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenw. *N. perennans* se morfologicky velmi podobá druhu *N. malicorticis*, některé jejich odlišnosti jsou uvedeny v kapitole 3.2.8.

Apothecia vypadají téměř stejně jako apothecia druhu *N. malicorticis*, ale vřeka měří $86-170 \times 8-14 \mu\text{m}$ a askospory $11,5-22,7 \times 4,2-8,5 \mu\text{m}$ (Kienholz 1939, Verkley 1999).

Konidiomata jsou stejná jako u druhu *N. malicorticis*, ale makrokonidie jsou přímé nebo jen lehce zakřivené, jednobuněčné, hyalinní, tenkostěnné, $12-25 \times 3-6 \mu\text{m}$, později s 1-2 přehrádkami (Kienholz 1939, Verkley 1999).

Způsobuje rakovinu kůry a kruhovou hnědou hnilobu. Napadá stejné hostitele jako *N. malicorticis*. Byl zaznamenán v Severní Americe a v Evropě (v Nizozemí) (Verkley 1999).

4.5 *Cryptosporiopsis kienholzii* Seifert, Spotts & Lévesque

Jedná se o nedávno objevené anamorfní stádium druhu *Neofabraea* sp., jehož teleomorfa dosud nebyla pozorována. Tento druh byl objeven při studiu fylogenetických vztahů v rámci rodu *Neofabraea*. Jeden izolát pocházející z jablka z Portugalska byl určen na základě morfologie jako *N. malicorticis* a druhý, pocházející z nekrózy kůry jabloně z kanadské provincie Nové Skotsko, byl označen za druh *N. perennans*. Pomocí molekulárně-biologických metod však bylo odhaleno, že se jedná o nový druh (de Jong et al. 2001). Později byl nalezen také v USA, na hruškách a na jablkách se symptomy

kruhové hnědé hniloby (Henriquez et al. 2004, Spotts et al. 2009), a v Austrálii, ve sbírkových vzorcích pocházejících z jabloní (Cunnington 2004).

Konidiomata v *in vitro* podmínkách jsou velmi variabilní, mohou být acervulární, stromatická, méně často sporodochiální až synnematózní, jednotlivá nebo sloučená, vyvíjejí se na povrchu agarů nebo jsou submerzní, měří 100-400 μm , jsou světle až tmavě hnědá, submerzní až černá. Konidiofory obsahují terminální fialidy na cylindrických hyfách, řetízky 2-3 fialid nebo páry či přesleny 3 fialid na laterálních metulách. Konidiogenní buňky jsou fialidické, terminální nebo interkalární. Konidie tvoří bílou až šedou nebo nahnědlou masu. Makrokonidie jsou jednobuněčné, 12-17,5 \times 2,5-3,5 μm velké, protáhle elipsoidní, někdy lehce nebo silně zakřivené. Mikrokonidie se mohou tvořit v konidiomatech nebo na vzdušném myceliu. Jsou elipsoidní, protáhle elipsoidní, lehce zakřivené, hyalinní nebo tenkostěnné, 2,5-6,5 \times 1,5-2,5 μm velké (Spotts et al. 2009).

Na bramborovo-dextrózovém agaru vytváří žlutavě hnědé až olivově hnědé kolonie, reverz má obvykle šedooranžový střed a tmavě fialový až modročerný okraj. Na sladínovém agaru jsou kolonie bílé až krémově zbarvené kolonie, někdy s hnědooranžovými skvrnami, vzdušné mycelium obvykle chybí. Reverz je bílý, někdy s hnědooranžovým kruhem (Spotts et al. 2009).

4.6 Identifikace a detekce

Určení druhu na základě morfologie je mnohdy neúspěšné, protože houby rodu *Neofabraea* často v *in vitro* podmínkách nesporulují. Morfologické a fyziologické charakteristiky jednotlivých druhů jsou však velmi podobné (de Jong et al. 2001) a druhy se příliš neliší ani svými projevy po napadení hostitele. Čtyři z pěti druhů *Neofabraea* jsou původci kruhové hnědé hniloby jablek a hrušek. Na plodech tvoří podobné léze a symptomy rakoviny nebo antraknózy kůry způsobují jen zřídka nebo vůbec ne (Spotts et al. 2009). Navíc situaci ztěžuje geografické rozšíření druhů, protože se často na jednom území vyskytuje současně více než jeden druh rodu *Neofabraea* (Gariépy et al. 2003). Klasické mikrobiologické kultivační metody jsou navíc poměrně časově náročné a do jisté míry subjektivní. V současné době je však potřeba rychlá a jednoznačná detekce patogena. Evropská a středozemní organizace ochrany rostlin (EPPO) vydala certifikační schéma, podle něhož je vyžadována absence *N. alba* a *N. malicorticis* v matečných rostlinách jabloní, hrušní a kdouloní (Anonymus 1999). To všechno jsou důvody pro používání moderních metod pro identifikaci a detekci *Neofabraea* sp.

4.6.1 Molekulárně-genetické metody

Jednou z nich je polymerázové řetězová reakce s použitím specifických primerů. Byly vyvinuty druhově specifické primery na základě analýzy genu pro β -tubulin pro všech pět druhů rodu *Neofabraea*. Tyto primery si udržují svoji specifitu i při aplikaci v kombinaci s primery pro ostatní druhy *Neofabraea*, tudíž se dají použít také pro multiplex PCR amplifikaci. To zajišťuje rychlou a přesnou identifikaci patogena. Metoda se osvědčila při detekci *Neofabraea* spp. v axenických kulturách i v plodech jabloní. Možnost identifikovat patogena přímo z rostliny, bez nutnosti předchozí izolace čisté kultury, proces značně usnadňuje (Gariépy et al. 2003). Dále byly vyvinuty specifické primery pro druh *N. alba* v oblasti vnitřních přepisovaných mezerníků ITS1 a ITS2 jaderné ribozomální DNA. Výhodou této metody, oproti té předchozí, je její vyšší citlivost způsobená větším počtem kopií genů pro rRNA v genomu a nižší cena, protože používá mnohem menší množství teplotně stabilní DNA polymerázy, která je nejdražší chemikálií používanou při PCR. Tyto primery umožnily identifikaci *N. alba* zatím pouze v *in vitro* podmínkách (Salava et Novotný 2008). Úspěšnost identifikace za použití polymerázové řetězové reakce se specifickými primery v oblasti genu pro β -tubulin může dosahovat 90 %, zatímco při určování výhradně podle morfologických znaků se pohybuje kolem 60 %. Nízká úspěšnost při použití konvenčních metod je způsobena tím, že některé vzorky vůbec nezačnou sporulovat (Gariépy et al. 2005).

Patogen se dá identifikovat také přímým sekvenováním vybraného úseku DNA a porovnáním s databází (např. GenBank). DNA se izoluje z čisté kultury, pomocí PCR se namnoží zvolený úsek DNA a ten se osekvenuje na sekvenátoru. Pořadí bází nukleových kyselin se pak porovná se sekvencemi uloženými v databázi. V mykologii se často používá např. sekvenace jaderné rDNA, mitochondriální rDNA a genu pro β -tubulin. Tyto úseky DNA se vyskytují u všech porovnávaných organismů, jsou evolučně konzervované a nepodléhají velkému selekčnímu tlaku. Jaderná rDNA je v molekulární taxonomii oblíbená z několika důvodů. Je přítomna u všech živých organismů, v genomu se vyskytuje ve více kopiích, je snadno dosažitelná pomocí univerzálních primerů a obsahuje mnoho podjednotek, a to jak konzervativních, tak i velmi variabilních, což umožňuje použití na různých taxonomických úrovních. Pro rozlišování hub na druhové úrovni se většinou používá sekvenace ITS, což jsou netranskribované oblasti mezi 18S a 5,8S rDNA (ITS1) a mezi 5,8S a 28S rDNA (ITS2) (Kolařík 2000).

4.6.2 Imunochemické metody

Další možnost spolehlivé a rychlé detekce patogena v rostlině představují imunochemické metody, které jsou založené na reakci antigenu a protilátky. Antigeny jsou látky, které rozpoznává imunitní systém a reaguje na ně. Imunitní receptory a protilátky rozpoznávají malou oblast molekuly antigenu zvanou epitop (Hořejší et Bartůňková 2009). Pro stanovení a vizualizaci vzniklého imunokomplexu se využívají různé imunochemické metody, při kterých je jedna ze složek (antigen nebo protilátka) značena definovanými a zjištěnými molekulami (J. Krátká, nepublikováno).

V první metodě se jako definovaná molekula používá enzym vázaný většinou na protilátku. Enzym vytvoří s vhodným substrátem barevný produkt. Nejčastější technikou v této skupině je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), která poskytuje kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení. Protilátka nebo antigen je vázán na pevnou bázi (na mikrotitrační destičku z polyvinylchloridu). Intenzita zbarvení po enzymatické přeměně substrátu je vyhodnocena spektrofotometricky. Na podobném principu je založena technika dot blot, která je však pouze kvalitativní. Protilátka či antigen je pevně navázán na nitrocelulóзовou membránu, vazba antigenu a protilátky je vizualizována zbarvením po enzymatické reakci. Další technikou je western blot, při níž se antigen nejprve rozdělí pomocí gelové elektroforézy a pak se přenese na nitrocelulóзовou membránu. Protilátky značené enzymem se dají použít také na zviditelnění antigenu *in vitro* nebo v pletivu hostitelské rostliny a následné zbarvení je sledováno světelným mikroskopem, tato technika se nazývá immunoenzymatic staining (J. Krátká, nepublikováno).

Další možností je označení protilátky fluoreskující molekulou. Tato metoda se označuje jako imunofluorescence a ke sledování reakce se používá fluorescenční mikroskop. Imunomagnetická metoda využívá protilátky značené oxidem železitým a komplex antigen-protilátka je oddělen pomocí magnetického pole. Protilátka může být značena také koloidním zlatem a komplex antigen-protilátka se sleduje pomocí světelného či elektronového mikroskopu. Metodou, která se dnes používá už jen výjimečně, je RIA (Radioimmunoassay), kdy jsou protilátky značeny radioaktivním izotopem (J. Krátká, nepublikováno).

Antigeny jsou většinou extrahovány ze všech částí houby. Antigeny mohou být proteiny, glykoproteiny, lipoproteiny či polysacharidy. Druhým typem antigenů jsou látky, které houba sekretuje do okolí (do média, půdy, vody, hostitele), jedná se o glykoproteiny,

polysacharidy a toxiny. Molekuly toxinů jsou ale příliš malé, a proto musí být navázány na protein, vzniká tzv. haptén (J. Krátká, nepublikováno).

Pro imunodetekci jsou používány polyklonální i monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky se získávají imunizací zvířete. Takové antisérum obsahuje mnoho odlišných molekul imunoglobulinů a reaguje s řadou epitopů na určitém antigenu. Monoklonální protilátky mají vyšší specifitu a nehrozí u nich takové nebezpečí křížových reakcí (tedy že by reagovaly i s jinými antigeny). Získávají se pěstováním určitého izolovaného klonu B lymfocytů, který se však musí immortalizovat, neboť B lymfocyty mají krátkou dobu života. Nejobvyklejším způsobem immortalizace je fúze B lymfocytu s myelomovou buněčnou linií, která roste dobře a neomezeně ve tkáňové kultuře. Vzniká tak hybridom, hybridní buňka, která produkuje žádané protilátky a zároveň dobře roste v kultuře (Hořejší et Bartůňková 2009).

Imunodetekcí *N. alba* a *N. malicorticis* ve větvích a kmenech jabloní se zabývali Křížková et al. (2008). Pro stanovení přítomnosti (absence) patogenů používají nepřímou PTA-ELISA a dot blot. Metodika obsahuje také návod na přípravu protilátek, neboť komerční diagnostické soupravy pro detekci *N. alba* a *N. malicorticis* nejsou k dispozici.

5 Závěr

Studium endofytů se těší v posledních letech velkému zájmu mykologů. Výzkum se soustředí především na traviny a volně rostoucí dřeviny, ale doposud byl studován jen zlomek ovocných dřevin. Důraz je kladen zejména na studium endofytických hub jabloní, sledována byla také endofytická mykobiota vinné révy, třešně, borůvky, brusinky a ořešáku. Pozornost si ale jistě zaslouží také ostatní, doposud opomíjené, ovocné dřeviny, jako jsou višně, meruňka, hrušně, švestka aj. Těmito ovocnými druhy se zatím nikdo nezabýval, přestože poznání endofytů může přispět ke zdokonalení ochrany před fytopatogenními druhy hub, tím omezení výskytu nežádoucích chorob a celkovému zvýšení výnosu ovoce.

Rod *Neofabraea* je významný fytopatogenní rod. Jeden druh je patogen topolů a ostatní čtyři druhy napadají především jabloně a hrušně. Vyvolávají onemocnění kůry a skládkovou chorobu, která činí velké ztráty na sklizeném ovoci.

Ve své diplomové práci se zaměřím na poznání ekologie fytopatogenního druhu *Neofabraea alba*. Kmeny *N. alba* budu popisovat na základě mikromorfologických a makromorfologických znaků a také na základě biochemických znaků, např. zhodnocení aktivity vybraných enzymů. Kromě toho budu z jablek izolovat další druhy hub, endofytické a saprotrfní, se záměrem zjistit, zda by se některý druh nedal využít jako antagonist a k potlačení *N. alba*. Kmeny hub izolované z jablek budu identifikovat na základě morfologických, ale také molekulárně-biologických metod.

6 Použitá literatura

- ABELN E. C. A., DE PAGTER M. A., VERKLEY G. J. M. (2000): Phylogeny of *Pezizula*, *Dermea* and *Neofabraea* inferred from partial sequences of the nuclear ribosomal RNA gene cluster. – *Mycologia* 92(4):685-693.
- ANONYMUS (1999): Normes OEPP. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. – EPPO Bulletin 29(3):239-252.
- ANONYMUS (2009a): Spotřeba ovoce a zeleniny v hodnotě čerstvé (na obyvatele a rok). - <http://www.czso.cz/csu/2009edicniplan.nsf/tab/7A0038E263>.
- ANONYMUS (2009b): EPPO A1 and A2 Lists of pests recommended for regulation as quarantine pests as approved by EPPO Council in September 2009. - [http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(18\)_A1A2_2009.pdf](http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(18)_A1A2_2009.pdf).
- ANONYMUS (2010): Sklizeň z ovocných stromů a keřů v roce 2009. - [http://czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/B900227D47/\\$File/21021004.pdf](http://czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/B900227D47/$File/21021004.pdf).
- BIGGS A. R. (1990): Apple Scab. – In: Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), *Compendium of Apple and Pear Diseases*, p. 6-9, St Paul.
- BLAŽEK J. et al. (2001): *Ovocnictví*. – 384 p. Praha.
- BLAŽEK J. (2001): *Pěstujeme jabloně*. – 280 p. Praha.
- BLAŽEK J., KLOUTVOROVÁ J. et KŘELINOVÁ J. (2006): Incidence of storage diseases on apples of selected cultivars and advanced selections grown with and without fungicide treatments. – *Hort. Sci. (Prague)* 33(3):87-94.
- BLAŽEK J., OPATOVÁ H., GOLIÁŠ J. et HOMUTOVÁ I. (2007): Ideotype of apples with resistance to storage diseases. – *Hort. Sci. (Prague)* 34(3):107-113.
- CARROLL G. C. (1986): The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. – In: Fokkema N. J. and Heuvel J. (eds.), *Microbiology of phyllosphere*, p. 205-222, Cambridge.
- CARDINALI S., GOBBO F. et LOCCI R. (1994): Endofiti fungini in tessuti fogliari di vite. – *Mic. Ital.* 1:81-84.
- CAMATTI-SARTORI V., DA SILVA-RIBEIRO R. T., VALDEBENITO-SANHUEZA R. M., PAGNOCCA F. C., ECHEVERRIGARAY S. et AZEVEDO J. L. (2005): Endophytic yeasts and filamentous fungi associated with southern Brazilian apple (*Malus domestica*) orchards subjected to conventional, integrated or organic cultivation. – *J. Basic Microbiol.* 45:397-402.

- CUNNINGTON J. (2004): Three *Neofabraea* species on pome fruit in Australia. – Australas. Plant Pathol. 33:453-454.
- DE JONG S. N., LÉVESQUE C. A., VERKLEY G. J. M., ABELN E. C. A., RAHE J. E. et BRAUN P. G. (2001): Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. – Mycol. Res. 105(6):658-669.
- DUGAN F. M. et ROBERTS R. G. (1994): Etiology of preharvest colonization of Bing cherry fruit by fungi. – Phytopathol. 84:1031-1036.
- DVOŘÁK A. (1987): Pěstování jabloní. – 352 p. Praha.
- ESSELN S. (1994): Untersuchen über Verteilung, Zusammensetzung und Bedeutung der endophytischen Mikroflora in gesunden und maukekranken Reben. – 152 p. Bonn.
- ESSELN S. et WELTZIEN H. C. (1996): Xylembesiedlung von Rebestecklingen durch endophytische Pilze in verschiedenen Kultursubstraten. – Z. PflKrankh. Pflschütz. 104: 346 – 352.
- GARIÉPY T. D., LÉVESQUE C. A., DE JONG S. N. et RAHE J. E. (2003): Species specific identification of the *Neofabraea* pathogen complex associated with pome fruits using PCR and multiplex DNA amplification. – Mycol. Res. 107(5):528-536.
- GARIÉPY T. D., RAHE J. E., LÉVESQUE C. A., SPOTTS R. A., SUGAR D. L. et HENRIQUEZ J. L. (2005): *Neofabraea* species associated with bull's-eye rot and cankers of apple and pear in the Pacific Northwest. – Can. J. Plant Pathol. 27:118-124.
- GRANADO J., THÜRIG B., KIEFFER E., PETRINI L., FLIESSBACH A., TAMM L., WEIBEL F. P. et WYSS G. S. (2008): Culturable fungi of stored 'Golden Delicious' apple fruits: a one-season comparison study of organic and integrated production systems in Switzerland. – Microb. Ecol. 56:720-732.
- GROVE G. G. (1990): Anthracnose and perennial canker. - In Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), Compendium of apple and pear diseases, p. 36-38, St. Paul.
- GUERBER J. C. et CORRELL J. C. (2001): Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*. – Mycologia 93 (1):216-229.
- GUTHRIE E. J. (1959): The occurrence of *Pezicula alba* sp.nov. and *P. malicorticis*, the perfect states of *Gloeosporium album* and *G. perennans*, in England. – Trans. Brit. mycol. Soc. 42:502-506.
- HENRIQUEZ J. L., SUGAR D. et SPOTTS R. A. (2004): Etiology of bull's eye rot of pear caused by *Neofabraea* spp. in Oregon, Washington, and California. – Plant Dis. 88:1134-1138.

- HENRIQUEZ J. L., SUGAR D. et SPOTTS R. A. (2006): Induction of cankers on pear tree branches by *Neofabraea alba* and *N. perennans*, and fungicide effects on conidial production on cankers. – Plant Dis. 90:481-486.
- HENRIQUEZ J. L., SUGAR D. et SPOTTS R. A. (2008): Effects of environmental factors and cultural practices on bull's eye rot of pear. – Plant Dis. 92:421-424.
- HLUCHÝ M., ACKERMANN P., ZACHARDA M., LAŠTŮVKA Z., BAGAR M., JETMAROVÁ E., PLÍŠEK B., SZŐKE L. et VANEK G. (2008): Ochrana ovocných dřevin a révy v ekologické a integrované produkci. – 498 p. Brno.
- HOŘEJŠÍ V. et BARTUŇKOVÁ J. (2009): Základy imunologie. – 320 p. Praha.
- JOHNSTON P. R. (1994): Endophytes of apple and kiwifruit. – In: Proc. 47th N. Z. Plant Protection Conf., p. 353-355.
- JUROCH J. (2006): Rzičnost hrušně – stále významnější choroba hrušní. – 8 p. Praha.
- KIENHOLZ J. R. (1939): Comparative study of the apple anthracnose and perennial canker fungi. – J. Agric. Res. 59:635-665.
- KIRK P. M., CANNON P. F., MINTER D. W. et STALPERS J. A. (eds.) (2008): Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 10th edition. – 772 p. Wallingford.
- KLOUTVOROVÁ J. et KUPKOVÁ J. (2007): Využití metod umělé infekce jablek patogenem *Pezicula alba* v procesu šlechtění jabloní. – Věd. práce ovocn. 20:23-27.
- KOLAŘÍK M. (2000): Molekulárně taxonomické metody v mykologii. – 27 p., ms. (Seminární práce: Knihovna Katedry botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, Praha 2).
- KŘÍŽKOVÁ I., NOVOTNÝ D. et KRÁTKÁ J. (2008): Optimalizované postupy pro detekci *Pezicula alba* a *P. malicorticis* v pletivech jabloní pomocí imunochemických metod. – 16 p. Praha.
- KUBÁT K. et al. (2002): Klíč ke květeně České republiky. – 928 p. Praha.
- LÁNSKÝ M., FALTA V., KLOUTVOROVÁ J., KOCOUREK F., STARÁ J. et PULTAR O. (2005): Integrovaná ochrana ovoce v systému integrované produkce. – 160 p. Holovousy.
- LUMBSCH H. T. et HUHNDORF S. M. (eds.) (2007): Outline of *Ascomycota* – 2007. – Myconet 13:1-58.
- MOSTERT L., CROUS P. W. et PETRINI O. (2000): Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. – Sydowia 52(1):46-58.
- NAQVI S. A. M. H. (ed.) (2004): Diseases of fruits and vegetables, Vol. II. – 688 p. Dordrecht.

- NOVOTNÝ D. (2003): A comparison of two methods for the study of microscopic fungi associated with oak roots. – Czech Mycol. 55:73-82.
- NOVOTNÝ D. (2007): Studium endofytických hub zemědělsky významných rostlin. – In: Nováková A. (ed.), Sborník z workshopu MICROMYCO 2007, 4.-5. září 2007, České Budějovice, p. 97-101, České Budějovice.
- NOVOTNÝ D., KRÍŽKOVÁ-KUDLÍKOVÁ I., SALAVA J. et KRÁTKÁ J. (2009): Houby rodu *Neofabraea* – ekologie, patogenita a detekce. – In: Česko-slovenská mykologická konference – abstrakty, p. 48, Praha
- OGAWA J. M., Zehr E. I., Bird G. W., Ritchie D. F., Uriu K., Uyemoto J. K. (1995): Compendium of stone fruit diseases. – 98 p. St. Paul.
- PETRINI O. (1985): Wirtsspezifität endophytischer Pilze bei Einheimischen *Ericaceae*. – Bot. Helv. 95:213-238.
- PETRINI O. (1986): Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. – In: Fokkema N. J. and Heuvel J. (eds.), Microbiology of phyllosphere, p. 175-187, Cambridge.
- PETRINI O. (1991): Fungal endophytes of tree leaves. – In: Andrews J. H. and Hirano S. S. (eds.), Microbial ecology of leaves, p. 179-197, New York.
- PUTNAM M. L. et ADAMS G. C. (2005): *Phlyctema vagabunda* causes coin canker of ash (*Fraxinus* spp.) in North America. – Plant Dis. 89(7):773.
- ROSSMAN A. Y., CASTLEBURY L. A., ADAMS G. C. et PUTNAM M. L. (2002): *Phlyctema vagabunda* isolated from coin cancer of ash trees in Michigan. – Plant Dis. 86(4):442.
- SALAVA J. et NOVOTNÝ D. (2008): Identifikace *Neofabraea alba* pomocí polymerázové řetězové reakce. – Mykologické listy 105:23-29.
- SERDANI M., CROUS P. W., HOLZ G. et PETRINI O. (1998): Endophytic fungi associated with core rot of apples in South Africa, with specific reference to *Alternaria* species. – Sydowia 50:257-271.
- SCHWEIGKOFER W. et PRILLINGER H. (1997): Untersuchung von endophytischen und latent pathogenen Pilzen aus Rebholz in Österreich und Südtirol. – Mitteil. Klost. 47:149-158.
- SPOTTS R. A. (1990): Bull's-eye rot. - In: Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), Compendium of apple and pear diseases, p. 56, St. Paul.
- SPOTTS R. A., SEIFERT K. A., WALLIS K. M., SUGAR D., XIAO CH. L., SERDANI M. et HENRIQUEZ J. L. (2009): Description of *Cryptosporiopsis kienholzii* and species

- profiles of *Neofabraea* in major pome fruit growing district in the Pacific Northwest USA. – Mycol. Res. 113:1301-1311.
- SUS J., BLAŽEK J., BOUMA J. et TUPÝ J. (2000): *Obrazový atlas jádrovin*. 104 p. Praha.
- SUTTON T. B. (1990): Bitter rot. – In Jones A. L. et Aldwinckle H. S. (eds.), *Compendium of apple and pear diseases*, p. 15-16, St. Paul.
- ŠILHÁNOVÁ M. (2004): *Houby révy vinné*. – 42 p., ms. (Seminární práce: Knihovna Katedry botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Benátská 2, Praha 2).
- ŠINDELKOVÁ M. (2008): *Nový patogen *Monilinia fructicola**. – 8 p. Praha.
- VERKLEY G. J. M. (1999): A monograph of the genus *Pezicula* and its anamorphs. – Stud. Mycol. 44:1-180.
- ZHAI M., WEN X., LIU F., GAO Z. et ZHANG Y. (2009): Isolation of endophytic fungi from walnut and their antifungal activities. – J. Northw. Forest. Univ. 2009-03.